Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 605-619

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۶۱۹-۶۰۵

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره پوسته دانه نارنج استخراج شده به کمک مایکروویو

محمدتقی گلمکانی[1]*- غلامرضا مصباحی[2]- نصیره علوی[3]- آزیتا حسین‌زاده فربودی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۶

چکیده

هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی استخراج عصاره پوسته دانه نارنج به کمک مایکروویو در سطوح مختلف توان مایکروویو (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ وات)، زمان استخراج (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه)، مقدار نمونه (۵، ۱۰ و ۱۵ گرم) و حجم حلال (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌لیتر) بر میزان بازدهی، میزان ترکیبات زیست‌فعال (فنل و فلاونوئید کل) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد، قدرت احیای آهن، ظرفیت احیای مس و ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن) بود. همچنین، شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو با روش متداول (استخراج به کمک همزن مغناطیسی) مقایسه شد. شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو شامل توان ۲۰۰ وات، زمان استخراج ۱۲ دقیقه، ۵ گرم نمونه و ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال بود. در شرایط بهینه، میزان بازدهی، میزان ترکیبات فنلی کل، میزان فلاونوئید کل، IC_{50}، قدرت احیای آهن، ظرفیت احیای مس و ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن به‌ترتیب ۱۱/۵۷ درصد، ۱۵۵۵۰/۵۰ میکروگرم معادل گالیک اسید بر گرم، ۱۴۷۶/۲۲ میکروگرم معادل کوئرستین بر گرم، ۱۱/۳۳ میلی‌گرم در میلی لیتر، ۷/۱۲ میلی گرم آسکوربیک اسید بر گرم، ۶/۴۴ میلی گرم آسکوربیک اسید بر گرم و ۰/۴۳ میلی‌گرم EDTA بر گرم بود. تفاوت معنی‌داری بین میزان بازدهی، ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده به کمک مایکروویو با عصاره استخراج شده به روش متداول مشاهده نگردید. به‌طور کلی، استخراج به کمک مایکروویو به‌عنوان روشی سریع و دوست‌دار محیط زیست، می‌تواند روشی مناسب و کاربردی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از پوسته دانه نارنج معرفی شود.

واژه‌های کلیدی: پوسته دانه نارنج، عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مایکروویو.

مقدمه

ضایعات مواد غذایی در تمام فازهای چرخه مواد غذایی به عبارت دیگر طی تولید فرآورده‌های کشاورزی و صنعتی، فرآوری و توزیع، ایجاد می‌شوند. ترکیبات زیست‌فعال حاصل از ضایعات غذایی می‌توانند استخراج یابند و برای ایجاد مواد غذایی فراسودمند مورد استفاده قرار بگیرند. سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو) تخمین زده است تلفات و ضایعات در میوه‌جات و سبزیجات، بالاترین میزان را در میان تمام انواع مواد غذایی دارد و می‌تواند به ۶۰ درصد برسد. ضایعات میوه‌جات و سبزیجات شامل پوست، ساقه، دانه، پوسته، سبوس و باقیمانده‌ها پس از استخراج آب میوه، روغن، نشاسته و قند هستند (Sagar *et al.*, 2018 ،Kumar *et al.*,2017). ایجاد ترکیبات طعمی، ترکیبات فنلی، آنزیم‌ها و اسیدهای آلی از قسمت‌های ضایعات میوه‌های مختلف پوست وضایعات جامد مرکبات، تفاله و برگ سیب، دانه، پوست و تفاله انگور و پوست کیوی- و از قسمت‌های ضایعات سبزیجات تفاله هویج، پوست سیر، پوست پیاز، سیب زمینی و گوجه‌فرنگی و پوست چغندر قرمز گزارش شده است (Sagar *et al.*, 2018). پوسته دانه میوه‌ها، یکی از منابع ضایعات را تشکیل می‌دهد. Fidelis و همکاران (۲۰۱۸) ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد و قدرت احیای آهن) پوشش دانه میوه *Camu Camu* به‌عنوان یکی از ضایعات فرآوری این میوه، ارزیابی و گزارش کردند. همچنین، Figueroa و همکاران (۲۰۱۸) ترکیبات فنلی و فعالیت مهارکنندگی رادیکال پوسته دانه آووکادو به‌عنوان یک محصول جانبی مهم تعیین خصوصیت کردند. نتایج آنها نشان داد که پوسته دانه آووکادو، منبعی از ترکیبات زیست‌فعال است که می‌تواند در مواد غذایی مورد استفاده قرار بگیرد.

مرکبات، یکی از مهمترین فرآورده‌های کشاورزی در جهان است و در بیش از ۹۰ کشور و ناحیه در جهان تولید می‌شود. آنها متعلق به *Rutaceae aurantioideae* هستند. از اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی

۱، ۲، ۳ و ۴- دانشیار، استادیار، دانشجوی دکتری و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: golmakani@shirazu.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i4.77713

تولید و مصرف جهانی مرکبات یک دوره افزایشی فراوان را تجربه کرده است. تولید و صادرات مرکبات، در بسیاری از کشورها یک منبع مهم درآمد است. میزان کل تولید مرکبات در کشورهای عمده تولیدکننده در جهان طی سال‌های ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ میلادی، ۸۸ میلیون تن بود که از میان این کشورها، چین بزرگترین تولیدکننده بوده است (Ye *et al.*, 2017). باقیمانده‌ها در صنعت فرآوری مرکبات، ۵۰ تا ۶۵ درصد وزن کل میوه را تشکیل می دهند و به‌عنوان باقیمانده‌های اولیه برجای می‌مانند که منجر به مقادیر زیاد پوست، دانه و پالپ میوه می‌شوند. این باقیمانده‌های خوب، تحت عنوان ضایعات مرکبات شناخته می‌شوند و به‌عنوان یک مسئله زیست‌محیطی شدید می‌باشند (Marin, 2017). حدود ۳ تا ۵ درصد وزن میوه را دانه ها تشکیل می‌دهند. وزن هزار دانه مرکبات، محدوده ۶۵ تا ۱۹۷ گرم و نسبت Skin: flesh دانه ۰/۲۹ تا ۰/۶۵گزارش شده است (Yilmaz & Güneşer, 2017؛ Güneşer & Yilmaz, 2017).

دو نوع Orange، با تولید حدود ۱/۶ میلیون تن در ایران، وجود دارد: نوع شیرین، پرتقال (*Citrus sinensis*) و نوع ترش یا تلخ، نارنج (*Citrus aurantium*). یکی از ساختارهای درونی مرکبات، دانه‌ها هستند که حاوی چربی (۰/۵۲ درصد)، پروتئین (۳/۱ درصد)، فیبر (۵/۵ درصد)، خاکستر (۲/۵ درصد) و مواد تلخ هستند که تاثیر مهمی بر فرآوری مرکبات دارند. ترکیبات طبیعی مثل فنل‌ها، لیمونوئیدها، کومارین و آلکالوئیدها در پوست و دانه مرکبات، توجه زیادی را در تحقیقات به سمت خود جلب کرده است. گزارش شده است میزان این ترکیبات در دانه و پوست مرکبات بالاتر از قسمت‌های خوراکی است (Chavan *et al.*, 2018 ؛Ye *et al.*,2017). در عصاره متانولی دانه نارنج، نارینجین، نئوهسپریدین و فلاون‌ها، کافئیک اسید، پاراکوماریک اسید، فرولیک اسید و سیناپیک اسید شناسایی شد (Bocco *et al.*, 1998).

ترکیبات زیست‌فعال موجود در ضایعات صنعت کشاورزی با استفاده از تکنیک‌های مختلف می‌تواند بازیابی شود (Kumar *et al.*, 2017). از جمله روش‌های سنتی و معمول مورد استفاده برای استخراج ترکیبات فرّار، تقطیر با آب، تقطیر با بخار و ماسراسیون و روش‌های سنتی برای استخراج ترکیبات با فرّاریت کم (آنتی‌اکسیدان‌ها، رنگدانه‌ها، آروما و ترکیبات آلی دیگر) برپایه استخراج با حلال هستند (Vinatoru *et al.*, 2017). استخراج به کمک مایکروویو و استخراج به کمک فراصوت پرکاربردترین تکنیک‌های نوین و دوست‌دار محیط زیست استخراج هستند (Satari & Karimi, 2018). استخراج به کمک مایکروویو به دو دسته روش استخراج بدون حلال (برای استخراج ترکیبات فرّار) و روش استخراج با حلال (معمولا برای استخراج ترکیبات غیرفرّار) دسته‌بندی می‌شوند (Vinatoru *et al.*, 2017؛ Golmakani & Moayyedi, 2016). از جمله مزایای روش استخراج ترکیبات زیست‌فعال به کمک مایکروویو نسبت به روش‌های معمول استخراج شامل موارد زیر است: عملیات اتوماتیک، ایجاد موثرتر و انتخابی‌تر حرارتی و زمان کوتاه‌تر استخرج (Vinatoru *et al.*, 2017).

بر اساس مطالب ذکر شده، از میان ضایعات حاصل از فرآوری میوه‌جات و سبزیجات، پوسته دانه مرکبات، به‌عنوان یک محصول جانبی با ارزش، می‌تواند برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال منبع مناسبی باشد. از طرف دیگر، مایکروویو به‌عنوان روشی سریع و در نتیجه کاهش اثرات منفی بر ترکیبات زیست‌فعال طی استخراج معرفی شده است. بنابر این موارد، هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی متغیرهای توان مایکروویو، زمان استخراج، مقدار نمونه و حجم حلال بر بازدهی، میزان ترکیبات زیست‌فعال (ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل) و فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد، قدرت احیای آهن، ظرفیت احیای مس و ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن) عصاره پوسته دانه نارنج می‌باشد. پس از تعیین شرایط بهینه، میزان بازدهی، میزان ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده به کمک مایکروویو با روش متداول (استخراج به کمک همزن مغناطیسی) مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

متانول، معرف دی فنیل پیکریل هیدازیل[1]، کلرید آهن و معرف فروزین[2] مورد استفاده در روش کلاته‌کنندگی آهن از شرکت سیگما–آلدریچ (St. Louis, MO) خریداری گردید. هگزان، معرف نئوکوپرین[3] و تری کلرواستیک اسید[4] از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

متغیرهای مؤثر بر استخراج عصاره به کمک مایکروویو

چهار متغیر توان مایکروویو، زمان استخراج، مقدار نمونه و حجم حلال مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

استخراج عصاره

دانه‌های نارنج حاصل از ضایعات کارخانه لیموندیس واقع در منطقه بیضاء فارس بود که در آبان ماه سال ۱۳۹۲ خریداری شد و به‌صورت دستی، پوسته آنها جداسازی شد. ترکیب شیمیایی تشکیل دهنده پوسته دانه نارنج مطابق با استاندارد انجمن متخصصین شیمی غلات آمریکا (AACC, 2000) همراه با برخی تغییرات تعیین شد. استخراج از پوسته به کمک مایکروویو انجام شد. نسبت مشخصی از نمونه (۵، ۱۰ و ۱۵ گرم) و حلال متانول (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی لیتر) در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در معرض سطوح توان ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ وات در دستگاه

1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
2 Ferrozine reagent
3 Neocuproine reagent
4 Trichloroacetic acid

مایکروویو (ME3410W، سامسونگ، مالزی) قرار گرفت. سپس عصاره به‌وسیله فیلتراسیون، جداسازی شد. عصاره حاصل تا زمان آنالیز، در ظروف تیره و در یخچال نگهداری گردید. نمونه شاهد، عصاره استخراج شده به کمک همزن مغناطیسی (روش متداول) بود و تمام شرایط آن مشابه با شرایط بهینه روش استخراج به کمک مایکروویو بود (کوشش و گلمکانی، ۱۳۹۴). بهینه‌سازی استخراج به کمک مایکروویو توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و براساس حداکثر میزان بازدهی، حداکثر میزان فنل و حداکثر میزان فلاونوئید کل، حداکثر قدرت احیای آهن، حداکثر ظرفیت احیای مس، حداکثر ظرفیت کلاته‌کنندگی و حداقل میزان IC_{50} انجام شد.

جدول ۱-طرح ماتریس مورد استفاده در بهینه‌سازی متغیرها

ردیف	توان (A: وات)	زمان (B: دقیقه)	مقدار نمونه (C: گرم)	حجم حلال (D: میلی‌لیتر)
۱	۱۰۰	۵	۵	۱۰۰
۲	۱۰۰	۵	۵	۲۰۰
۳	۱۰۰	۵	۱۵	۱۰۰
٤	۱۰۰	۵	۱۵	۲۰۰
٥	۱۰۰	۱۰	۱۰	۱۵۰
٦	۱۰۰	۱۵	۵	۱۰۰
۷	۱۰۰	۱۵	۵	۲۰۰
۸	۱۰۰	۱۵	۱۵	۱۰۰
۹	۱۰۰	۱۵	۱۵	۲۰۰
۱۰	۲۰۰	۵	۱۰	۱۵۰
۱۱	۲۰۰	۱۰	۵	۱۵۰
۱۲	۲۰۰	۱۰	۱۰	۱۰۰
۱۳	۲۰۰	۱۰	۱۰	۱۵۰
۱٤	۲۰۰	۱۰	۱۰	۱۵۰
۱٥	۲۰۰	۱۰	۱۰	۱۵۰
۱٦	۲۰۰	۱۰	۱۰	۱۵۰
۱۷	۲۰۰	۱۰	۱۰	۱۵۰
۱۸	۲۰۰	۱۰	۱۰	۱۵۰
۱۹	۲۰۰	۱۰	۱۰	۲۰۰
۲۰	۲۰۰	۱۰	۱۵	۱۵۰
۲۱	۲۰۰	۱۵	۱۰	۱۵۰
۲۲	۳۰۰	۵	۵	۱۰۰
۲۳	۳۰۰	۵	۵	۲۰۰
۲٤	۳۰۰	۵	۱۵	۱۰۰
۲٥	۳۰۰	۵	۱۵	۲۰۰
۲٦	۳۰۰	۱۰	۱۰	۱۰۰
۲۷	۳۰۰	۱۵	۵	۱۰۰
۲۸	۳۰۰	۱۵	۵	۲۰۰
۲۹	۳۰۰	۱۵	۱۵	۱۰۰
۳۰	۳۰۰	۱۵	۱۵	۲۰۰

جدول ۲- آنالیز واریانس مدل‌های برازش شده در بهینه‌سازی بازدهی، ترکیبات زیست‌فعال و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره پوسته دانه نارنج

پاسخ	مدل			عدم برازش*			R^2 تنظیم شده**	R^2 پیش‌بینی شده***	مدل	تکرارپذیری****
		P (احتمال)	ارزش F		P (احتمال)	ارزش F				
میزان بازدهی[1]	معنی‌دار	<۰/۰۰۰۱	۸۳/۲۲	غیرمعنی‌دار	۰/۲۶۰۷	۱/۸۳	۰/۹۷۱۴	۰/۹۳۸۷	درجه دو	۳۵/۳۴۷
میزان ترکیبات فنل کل[2]	معنی‌دار	<۰/۰۰۰۱	۱۱۴/۰۰	غیرمعنی‌دار	۰/۱۳۳۱	۲/۷۷	۰/۹۶۸۹	۰/۹۴۹۸	درجه دو	۵۱/۵۰۰
میزان فلاونوئید کل[3]	معنی‌دار	<۰/۰۰۰۱	۱۸۵/۰۲	معنی‌دار	۰/۰۱۳۱	۸/۷۰	۰/۹۸۵۹	۰/۹۷۰۹	درجه دو	۵۸/۲۸۲
IC_{50}[4]	معنی‌دار	<۰/۰۰۰۱	۹۵/۱۷	غیرمعنی‌دار	۰/۱۹۹۵	۲/۱۹	۰/۹۷۵۰	۰/۹۶۲۹	درجه دو	۴۲/۰۷۶
قدرت احیای آهن[5]	معنی‌دار	<۰/۰۰۰۱	۹۶/۹۹	معنی‌دار	۰/۰۱۲۳	۸/۹۷	۰/۹۷۳۳	۰/۹۴۳۳	درجه دو	۴۰/۶۹۹
ظرفیت احیای مس[6]	معنی‌دار	<۰/۰۰۰۱	۲۳/۱۳	غیرمعنی‌دار	۰/۴۰۵۶	۱/۲۲	۰/۷۹۲۳	۰/۷۲۶۳	درجه دو	۱۵/۳۷۲
ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن[7]	معنی‌دار	<۰/۰۰۰۱	۱۳۶/۵۶	غیرمعنی‌دار	۰/۰۶۰۴	۴/۲۲	۰/۹۷۹۱	۰/۹۶۳۶	درجه دو	۴۷/۲۱۱

[1]درصد، [2]میکروگرم معادل گالیک اسید بر گرم نمونه؛ [3]میکروگرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه؛ [4]میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ [5]میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه؛ [6]میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه؛ [7]میلی‌گرم EDTA بر گرم نمونه
*نوسان داده‌ها پیرامون مدل برازش شده؛ **مقیاسی از میزان نوسان پیرامون میانگین توضیح داده شده به‌وسیله مدل که با افزایش عبارات موجود در مدل، کاهش می‌یابد. ؛ ***مقیاسی از میزان نوسان در داده‌های پیش‌بینی شده جدید به‌وسیله مدل؛ ****تکرارپذیری، نسبت سیگنال به نویز (S/N) می‌باشد.

بازده استخراج

حلال از عصاره با تبخیر در انکوباتور (Fisher، آمریکا) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، جداسازی شد. بازدهی استخراج از تقسیم وزن عصاره خشک شده بر حجم حلال به‌دست آمد و برحسب درصد گزارش شد (کوشش و گلمکانی، ۱۳۹۴).

اثر متغیرهای استخراج بر ترکیبات زیست‌فعال عصاره

میزان ترکیبات فنلی کل

میزان ترکیبات فنل کل عصاره از یک غلظت انتخاب شده (۰/۱ گرم در میلی‌لیتر) بر اساس روش Habibi و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد. میزان ترکیبات فنلی کل، با استفاده از معادله منحنی استاندارد ($y=0.0005x-0.0088$، y و x به‌ترتیب جذب و میکروگرم معادل گالیک اسید در میلی‌لیتر) بر حسب میکروگرم معادل گالیک اسید بر گرم نمونه گزارش شد.

میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل از یک غلظت انتخاب شده (۰/۱ گرم در میلی‌لیتر) بر طبق روش Habibi و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد. منحنی استاندارد آن ($y=0.0164x-0.0451$؛ y و x به‌ترتیب جذب و بر حسب میکروگرم معادل کوئرستین در میلی‌لیتر) رسم گردید. میزان فلاونوئید کل، برحسب میکروگرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه گزارش شد.

اثر متغیرهای استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره

مهار رادیکال آزاد DPPH

جهت تعیین مهار رادیکال آزاد عصاره، از روش Habibi و همکاران (۲۰۱۵) همراه با برخی اصلاحات استفاده شد. از محدوده غلظت‌های مختلف (از ۰/۰۱ گرم در میلی‌لیتر تا ۱/۰۰ گرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. نسبت حجم نمونه به DPPH، ۱:۳ (DPPH: نمونه) انتخاب شد. نتایج به‌صورت IC_{50}[1] (میلی‌گرم در میلی لیتر) گزارش شد.

قدرت احیای آهن

قدرت احیای آهن از یک غلظت انتخاب شده (۰/۵ گرم در میلی‌لیتر) بر اساس روش Rekha و همکاران (۲۰۱۲) همراه با برخی اصلاحات، تعیین شد. با استفاده از معادله منحنی استاندارد ($y=10.789x-0.0129$، y و x به‌ترتیب جذب و میلی‌گرم آسکوربیک اسید در میلی‌لیتر)، قدرت احیای آهن برحسب میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه گزارش شد.

1 Extract concentration providing 50% inhibition

ظرفیت احیای مس

ظرفیت احیای مس از یک غلظت انتخاب شده (۰/۱ گرم در میلی‌لیتر) بر طبق روش Pascu و همکاران (۲۰۱۴) با برخی اصلاحات، تعیین گردید. ظرفیت احیای مس با استفاده از معادله منحنی استاندارد (y=5.7057x+0.902؛ y و x به‌ترتیب جذب و میلی‌گرم آسکوربیک اسید در میلی‌لیتر) برحسب معادل میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه گزارش شد.

ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن

به منظور تعیین ظرفیت کلاته‌کنندگی عصاره، از روش Oyetayo و همکاران (۲۰۰۹)، استفاده شد. از معادله منحنی استاندارد (y=-10.355x+0.9956؛ y و x به‌ترتیب جذب و میلی‌گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) در میلی‌لیتر)، ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن محاسبه گردید و بر حسب میلی‌گرم EDTA بر گرم نمونه گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای بررسی تاثیر متغیرها و بهینه‌سازی، از روش سطح پاسخ (با طرح مرکب مرکزی) که از متداول‌ترین و پرکاربردترین اشکال روش سطح پاسخ است، به عنوان طرح آزمایش استفاده شده است. طرح مرکب مرکزی شامل چهار متغیر هر کدام در سه سطح و در مجموع سی آزمایش بود، استفاده گردید. از ۳۰ آزمایش این طرح، شش تکرار در نقطه مرکزی قرار داشتند. از نرم‌افزار Design Expert V10 (هنپین، مینیسوتا) برازش شده به معادله چند جمله‌ای درجه دو، جهت آنالیز ارتباط بین متغیرها و پاسخ‌های فرآیند و همچنین پیش‌بینی و تایید معادلات مدل، استفاده گردید. $P< 0.01$ به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن از نظر آماری انتخاب شد.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی پوسته دانه نارنج

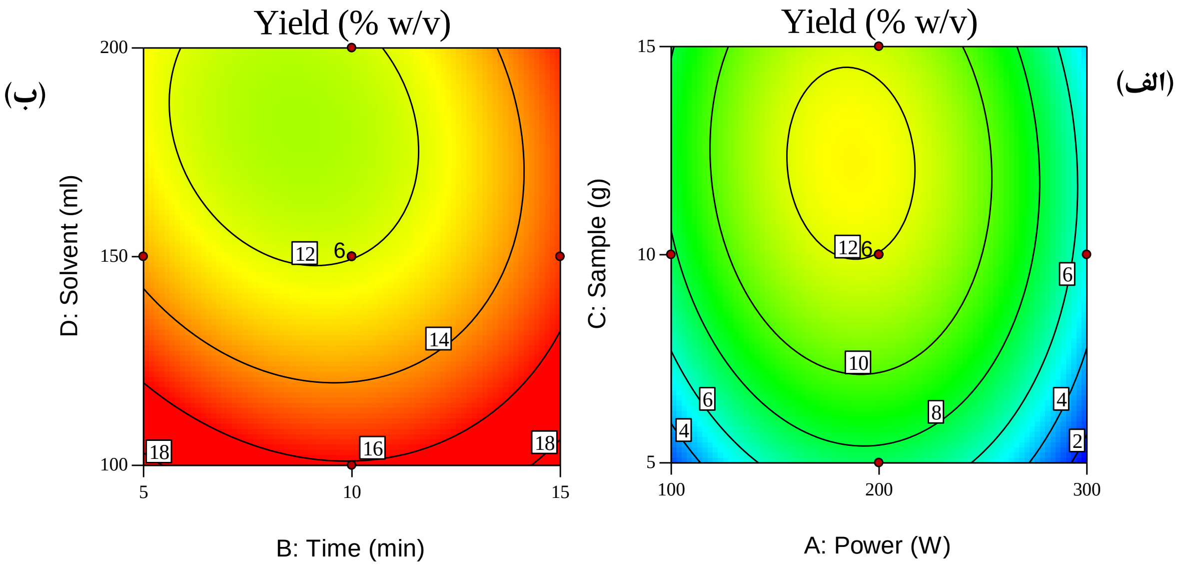
ترکیبات تشکیل‌دهنده پوسته شامل رطوبت ۱/۸۰ درصد، چربی ۱/۳۰ درصد، پروتئین ۳/۴۷ درصد، خاکستر ۱/۵۰ درصد و کربوهیدرات ۹۱/۹۳ درصد بود. بیشترین و کمترین جزء تشکیل‌دهنده، کربوهیدرات و چربی بودند.

آنالیز واریانس مدل‌ها

خلاصه آنالیز واریانس مدل‌های برازش شده در بهینه‌سازی بازدهی، ترکیبات زیست‌فعال و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره پوسته دانه نارنج در جدول ۲ گزارش شده است. تکرارپذیری، نسبت سیگنال به نویز را اندازه می‌گیرد. این نسبت برای اعداد بیشتر از ۴، مطلوب است.

بازدهی استخراج

اعداد بازدهی در جدول ۳ و شکل ۱ نشان داده شده است. مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف از استاندارد بازدهی به‌ترتیب۱/۴۰، ۱۶/۱۰، ۹/۸۰ و ۰/۵۰ درصد بود. متغیرهای توان، زمان، مقدار نمونه و حجم حلال رابطه‌ای معنی‌دار با بازدهی استخراج داشتند.



شکل ۱- اثر متغیرهای توان، زمان، مقدار نمونه و حجم حلال بر بازدهی استخراج پوسته دانه نارنج

جدول ۳- اثر متغیرهای استخراج بر بازدهی، ترکیبات زیست‌فعال و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره پوسته دانه نارنج

ردیف	بازدهی[1]	میزان ترکیبات فنل کل[2]	میزان فلاونوئید کل[3]	IC_{50}[4]	قدرت احیای آهن[5]	ظرفیت احیای مس[6]	ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن[7]
۱*	۸/۵۰	۳۹۵۰/۱۶	۶۲۸/۷۰	۶۴/۰۰	۳/۶۰	۱/۱۴	۰/۲۹
۲	۱/۴۰	۱۲۰۱۷/۱۰	۱۲۹۶/۷۰	۷۳/۵۰	۲/۴۳	۰/۷۶	۰/۳۰
۳	۱۳/۶۹	۱۴۶۱/۸۶	۲۳۹/۸۱	۷۴/۶۰	۱/۷۰	۱/۲۷	۰/۰۷
٤	۷/۱۹	۲۴۲۲/۳۲	۵۹۶/۰۲	۶۰/۰۰	۰/۶۴	۱/۶۴	۰/۰۲
٥	۷/۵۰	۹۹۵۵/۱۳	۸۰۰/۷۹	۴۰/۰۰	۱/۱۶	۲/۳۶	۰/۲۷
٦	۱۱/۸	۱۲۵۵۳/۰۰	۷۴۰/۲۲	۳۷/۰۰	۱/۱۵	۳/۴۵	۰/۳۵
۷	۶/۵۴	۲۱۸۰۰/۰۰	۱۵۵۱/۷۷	۱۹/۸۰	۱/۸۴	۳/۴۸	۰/۴۸
۸	۱۶/۰۰	۹۰۸۸/۴۱	۱۹۴/۰۳	۸۸/۰۰	۰/۸۷	۲/۰۰	۰/۱۰
۹	۱۲/۰۰	۱۲۳۷۱/۱۰	۶۵۱/۴۰	۳۵/۹۰	۱/۰۶	۴/۲۱	۰/۱۶
۱۰	۱۳/۰۰	۴۴۸۸/۳۰	۷۲۵/۹۰	۳۲/۰۰	۱/۸۹	۴/۹۸	۰/۲۱
۱۱	۷/۳۹	۹۶۲۲/۶۰	۱۱۱۱/۹۳	۲۵/۵۱	۱/۱۵	۵/۱۷	۰/۳۳
۱۲	۱۶/۰۰	۴۷۹۶/۲۰	۴۷۳/۹۳	۴۳/۱۰	۴/۰۷	۴/۳۱	۰/۱۲
۱۳	۱۱/۰۵	۷۲۰۰/۰۰	۸۸۲/۸۱	۲۷/۹۰	۱/۸۴	۵/۶۰	۰/۲۱
۱٤	۱۲/۶۰	۶۲۷۱/۰۰	۸۷۳/۲۰	۲۶/۴۰	۱/۹۲	۵/۱۴	۰/۲۳
۱٥	۱۱/۷۰	۶۴۹۱/۵۲	۸۹۵/۶۳	۲۶/۰۰	۱/۸۸	۶/۹۶	۰/۲۲
۱٦	۱۱/۸۱	۵۸۰۰/۰۰	۸۷۳/۲۰	۳۰/۴۰	۱/۸۴	۶/۲۰	۰/۲۱
۱۷	۱۲/۰۰	۶۱۲۸/۶۶	۸۹۸/۸۳	۲۲/۲۰	۱/۹۷	۷/۲۷	۰/۲۲
۱۸	۱۱/۶۰	۶۵۹۰/۴۸	۹۰۸/۴۵	۲۴/۵۰	۱/۹۶	۶/۸۰	۰/۲۱
۱۹	۱۲/۲۰	۷۵۹۶/۳۰	۱۰۰۱/۷۱	۲۱/۰۰	۳/۳۸	۶/۹۹	۰/۲۴
۲۰	۱۲/۰۰	۴۴۴۹/۰۹	۶۷۷/۷۴	۵۴/۴۰	۰/۲۹	۵/۶۴	۰/۱۲
۲۱	۱۶/۱۰	۶۵۹۰/۴۸	۹۱۱/۶۵	۲۳/۵۰	۱/۸۸	۷/۸۸	۰/۲۳
۲۲	۸/۸۰	۴۵۰۴/۳۴	۳۴۲/۴۷	۳۲/۰۰	۲/۳۸	۴/۰۰	۰/۱۶
۲۳	۲/۵۰	۷۱۶۶/۶۰	۷۳۳/۹۲	۲۳/۶۰	۱/۵۹	۳/۶۰	۰/۳۳
۲٤	۱۱/۱۵	۵۸۹۷/۷۸	۲۷۷/۵۰	۶۱/۳۹	۰/۶۳	۲/۸۹	۰/۰۳
۲٥	۷/۰۹	۳۷۴۱/۸۰	۴۷۵/۵۳	۲۷/۵۰	۰/۲۴	۳/۵۷	۰/۱۲
۲٦	۵/۸۰	۴۷۷۵/۴۵	۶۲۹/۶۶	۲۴/۹۰	۱/۰۷	۵/۵۸	۰/۲۱
۲۷	۶/۳۰	۲۲۲۶/۳۰	۵۳۰/۴۰	۵۳/۰۰	۱/۴۸	۴/۶۴	۰/۱۳
۲۸	۴/۱۹	۵۸۷۳/۹۰	۱۰۶۸/۳۳	۱۷/۰۰	۲/۰۰	۵/۶۰	۰/۴۴
۲۹	۸/۳۰	۲۷۲۶/۸۰	۲۷۳/۵۲	۱۲۱/۰۰	۰/۷۶	۲/۱۱	۰/۰۲
۳۰	۷/۷۰	۱۵۹۶/۸۰	۶۰۱/۱۴	۵۴/۰۰	۱/۴۷	۵/۵۰	۰/۲۰

* در جدول ۱، هر یک از شرایط معرفی گردیده است.

[1]درصد، [2]میکروگرم معادل گالیک اسید بر گرم نمونه؛ [3]میکروگرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه؛ [4]میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ [5]میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه؛ [6]میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه؛ [7]میلی‌گرم EDTA بر گرم نمونه

اثر متقابل متغیرهای توان و زمان، توان و مقدار نمونه، توان و حجم حلال، و زمان و حجم حلال معنی‌دار بودند. افزایش مقدار نمونه تا تقریبا ۱۵ گرم و افزایش توان تا ۲۰۰ وات (شکل ۱ (الف))، باعث افزایش بازدهی شد اما در مقادیر بالاتر، بازدهی استخراج کاهش یافت. بر طبق شکل ۱ (ب) در کمترین حجم حلال با افزایش زمان از ۱۰ دقیقه تا ۱۵ دقیقه، بازدهی افزایش یافت. نتایج حاکی از افزایش بازدهی با افزایش توان تا میزان ۲۰۰ وات بود. افزایش انرژی تشعشع مایکروویو، نفوذ حلال به نمونه را افزایش می‌دهد که باعث انتقال مواد

از طریق تعامل مولکولی با میدان الکترومغناطیسی می‌شود. این نقل و انتقال سریع انرژی به حلال و ماتریکس موجب حل شدن ترکیبات می‌شود (Maran *et al.*,2014). همچنین افزایش توان مایکروویو می‌تواند دمای استخراج (به علت جذب انرژی مایکروویو) را افزایش دهد. افزایش دما منجر به کمتر شدن ویسکوزیته حلال (در کنار اثر حرارتی مایکروویو بر تخریب دیواره سلولی) شده، و در نتیجه نرخ انتشار ترکیبات از مواد به حلال را زیاد کند (Chyuen *et al.*,2018). با افزایش توان از ۲۰۰ به ۳۰۰ وات، بازدهی کاهش یافت. افزایش توان می‌تواند باعث جوشیدن سریع تر حلال شده، و در نتیجه فرآیند استخراج، سریع‌تر به اتمام برسد. از این رو ترکیبات، زمان کافی برای انتشار از ماده به محیط اطراف (حلال) را ندارند. بنابراین بازدهی در توان‌های بالا کاهش می‌یابد (Chyuen *et al.*,2018). نتایج بهتر بازدهی در مقدار کمتر حلال می‌تواند به این علت باشد که حجم حلال بیشتر، جذب انرژی مایکروویو توسط نمونه را کاهش می‌دهد چون انرژی بیشتری توسط حلال جذب می‌شود. در نتیجه شکستن دیواره سلولی و انتقال جرم را کاهش می‌دهد (Maran *et al.*,2014). با این وجود، یک نکته قابل ذکر اینکه بازدهی بیشتر لزوما منجر به میزان بالاتر ترکیبات مطلوب نمی‌شود چون ترکیبات دیگر (مانند پلی‌ساکاریدها، پروتئین و لیپید) هم‌زمان افزایش می‌یابد که سهم ترکیبات زیست‌فعال را کم می‌کند (Simić *et al.*, 2016). افزایش زمان، حاکی از افزایش بازدهی استخراج بود. زمان (در سطوح متوسط توان) به ترکیبات فرصت کافی می‌دهد که از ماتریکس سلولی به محیط اطراف (حلال) انتشار یابند. Setyaningsih و همکاران (۲۰۱۵) بهینه کردن شرایط استخراج ترکیبات فنلی از دانه برنج را بررسی کردند. نتایج آنها نشان از اثر مثبت افزایش زمان استخراج (۱۵–۵ دقیقه) بر میزان بازدهی داشت.

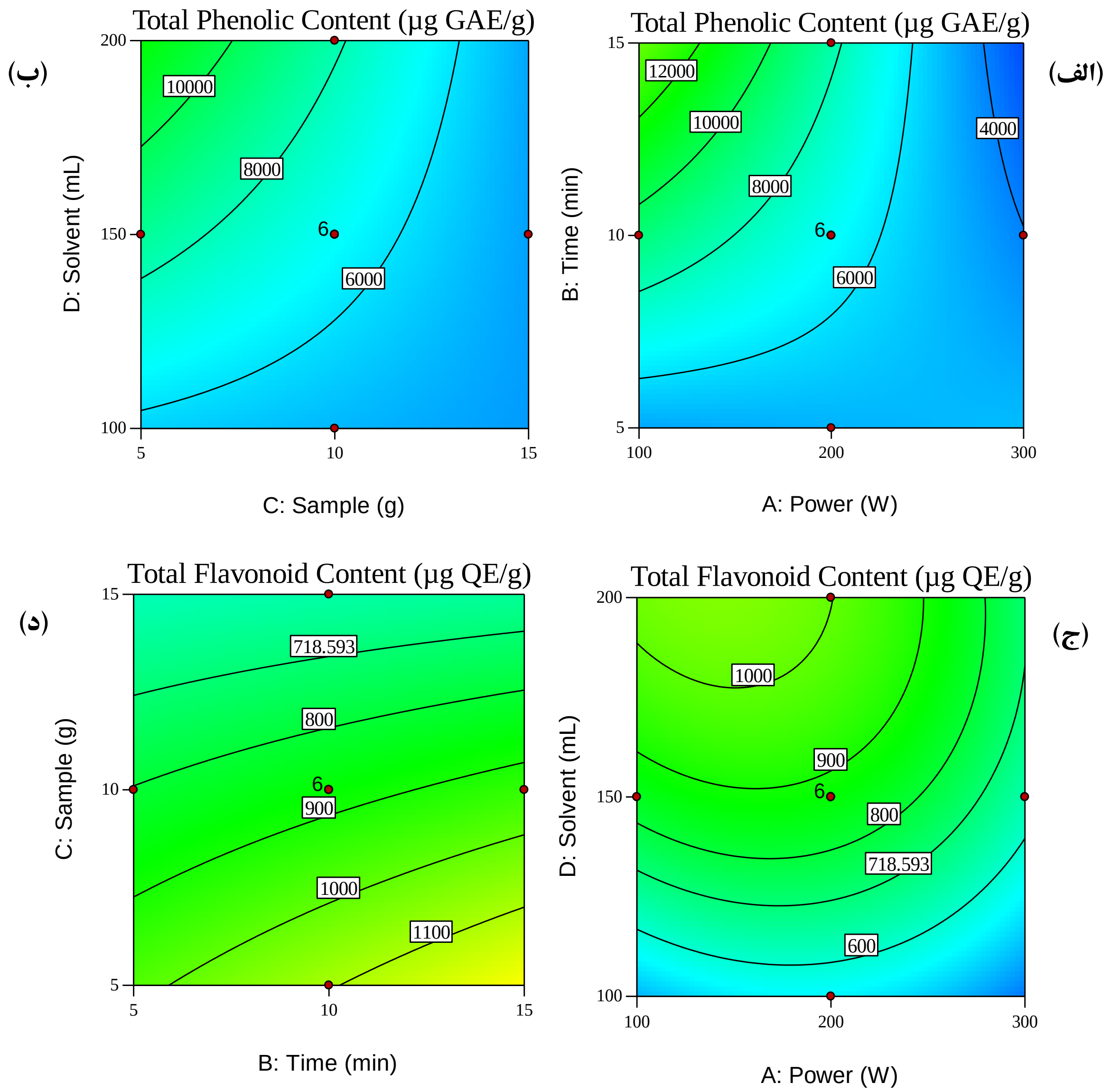
ترکیبات زیست‌فعال

میزان ترکیبات فنلی کل

میزان ترکیبات فنلی کل عصاره در جدول ۳ و شکل ۲ نشان داده شده است. مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف از استاندارد به‌ترتیب ۱۴۶۱/۸۶، ۲۱۸۰۰/۰۰، ۶۶۷۱/۱۲ و ۵۰۳/۴۷ میکروگرم معادل گالیک اسید بر گرم بوده اند. تمام متغیرها (توان، زمان، مقدار نمونه و حجم حلال) رابطه معنی‌داری با میزان ترکیبات فنلی کل عصاره داشتند. اثر متقابل متغیرها حاکی از معنی‌دار بودن توان و زمان، توان و مقدار نمونه، توان و حجم حلال، و مقدار نمونه و حجم حلال بودند. بر اساس شکل ۲ (الف) در زمان ۱۵ دقیقه میزان ترکیبات فنلی کل بیشتری در کمترین توان وجود داشت در حالیکه با افزایش توان، میزان ترکیبات فنلی کل، کاهش یافت.

در ۵ گرم نمونه با ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال (شکل ۲ (ب)) میزان ترکیبات فنل کل بیشتری مشاهده گردید و با افزایش مقدار نمونه، میزان ترکیبات فنلی کل کاهش یافت. اکثر آنتی‌اکسیدان‌ها در میوه‌جات از ترکیبات فنلی نشات می‌گیرند (Anal *et al.*,2014). کاهش میزان ترکیبات فنلی کل با افزایش توان می‌تواند به علت تجزیه حرارتی ترکیبات زیست‌فعال باشد (Dahmoune *et al.*, 2013). بر این اساس، با افزایش توان به ترکیبات فنلی بیشتری در عصاره نمی‌توان دست یافت. افزایش زمان، میزان ترکیبات فنلی کل را افزایش داد. Jokić و همکاران (۲۰۱۲) ترکیبات فنلی را از بروکلی به کمک مایکروویو استخراج نمودند و مشاهده کردند افزایش زمان (۱– ۲۷ دقیقه)، اثر مثبت بر میزان ترکیبات فنلی کل داشته است.

همچنین، نتایج نشان داد که با افزایش حجم حلال، میزان ترکیبات فنلی کل افزایش می‌یابد. افزایش حجم حلال، به عبارت دیگر ایجاد گرادیان بزرگتری از غلظت، می‌تواند انتقال جرم را بهتر کند و از این رو، حرارت کمترِ ایجاد شده به علت اعمال کمترین توان مایکروویو و کاهش نفوذ مایکروویو به درون نمونه را جبران نماید (Dahmoune *et al.*,2013). ترکیبات فنلی، ترکیباتی قطبی هستند. بنابراین، حلالی انتخاب می‌شود که توانایی استخراج این ترکیبات از نمونه را داشته باشد. ثابت دی الکتریک، توانایی یک ماده در ذخیره تابش الکترومغناطیسی را شرح می‌دهد. فاکتور افت دی‌الکتریک نشان‌دهنده توانایی تبدیل انرژی مایکروویو جذب شده درون یک ماده به حرارت است. از این دو ویژگی، فاکتور اتلاف تعریف می‌شود که توانایی حلال در جذب انرژی مایکروویو و تبدیل آن به حرارت را بیان می‌کند. آب بالاترین ثابت دی‌الکتریک و کمترین فاکتور اتلاف را دارد. متانول، ثابت دی‌الکتریک نسبتا بالا و بیشترین میزان فاکتور اتلاف دارد بدان معنا که متانول می‌تواند بیشترین انرژی مایکروویو را جذب کند و آن را بهتر از سایر حلال‌ها تبدیل به حرارت کند (Hemwimon *et al.*, 2007، Chan *et al.*, 2011 ،Dahmoune *et al.*, 2013). این ویژگی متانول، تحت عنوان تئوری دیواره سلولی شکسته شده، توضیح داده می‌شود بر این اساس که حلال‌های شفاف به مایکروویو بهتر از حلال‌های جذب‌کننده مایکروویو هستند (Proestos & Komaitis, 2008). در مقدار کمتر نمونه، میزان ترکیبات فنلی کل بیشتری در عصاره وجود داشت. Ballard و همکاران (۲۰۱۰) ترکیبات فنلی را از پوست بادام زمینی به کمک مایکروویو استخراج نمودند. نتایج آنها نشان داد که افزایش مقدار پوست (از ۱/۵ به ۳/۵ گرم) موجب کاهش میزان ترکیبات فنلی کل (تا ۳۵/۸ درصد) گردید. آنها گزارش نمودند افزایش مقدار نمونه (این افزایش در حالیست که حجم حلال، ثابت مانده است) مساحت سطحی در دسترس برای حلال جهت نفوذ به ماتریکس نمونه و حل کردن ترکیبات فنلی را کاهش داده و در نتیجه موجب کاهش استخراج این ترکیبات گردیده است.



شکل ۲- اثر متغیرهای توان، زمان، مقدار نمونه و حجم حلال بر میزان ترکیبات فنلی کل و میزان فلاونوئید کل.

میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل عصاره در جدول ۳ و شکل ۲ گزارش شده است. مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف از استاندارد به‌ترتیب ۱۹۴/۰۳، ۱۵۵۱/۷۷، ۷۲۸/۹۹ و ۳۱/۰۳ میکروگرم معادل کوئرستین بر گرم به‌دست آمد. رابطه تمام متغیرها (توان، زمان، مقدار نمونه و حجم حلال) با میزان فلاونوئید کل، معنی‌دار بود. اثر متقابل متغیرهای توان و مقدار نمونه، توان و حجم حلال، زمان و مقدار نمونه، زمان و حجم حلال، و مقدار نمونه و حجم حلال معنی‌دار به‌دست آمدند. با افزایش توان از ۱۰۰ وات به ۱۵۰ وات، در بیشترین حجم حلال (شکل ۲ (ج))، میزان فلاونوئید کل افزایش یافت. در سطوح بالاتر توان، میزان فلاونوئید کل کاهش یافت. بر طبق شکل ۲ (د)، در کمترین مقدار نمونه با گذشت زمان، میزان فلاونوئید کل، افزایش یافت. در سطوح بالای توان، کاهش در میزان ترکیبات فلاونوئیدی مشاهده گردید. اثر افزایش توان، افزایش قدرت میدان الکتریکی می‌باشد. در نتیجه مواد دی‌الکتریک درون نمونه را سریعتر گرم می‌کند.

اختلاف اثر توان مایکروویو در کاهش یا افزایش ترکیبات مختلف می‌تواند بدین علت باشد که حرارت‌دهی انتخابی و افتراقی درون یک ماده روی می‌دهد زیرا هر ترکیب ویژگی‌های جذب مایکروویو (ثابت دی‌الکتریک و فاکتور افت) متفاوتی دارد (Hayat *et al.*,2010). استفاده از سطح متوسطی از توان مایکروویو جهت رسیدن به حداکثر میزان فلاونوئید از دیدگاه صنعتی و مصرف انرژی مناسب تر است (Jokić *et al.*, 2012). افزایش زمان منجر به افزایش میزان ترکیبات

فلاونوئیدی شد. Xiao و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات فلاونوئیدی را از ریشه گون به کمک مایکروویو استخراج نمودند و گزارش کردند که در بین زمان‌های مختلف استخراج (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه)، میزان ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری تا زمان ۲۵ دقیقه به‌دست آوردند.

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مهار رادیکال آزاد DPPH

اعداد IC_{50} در جدول ۳ و شکل ۳ نشان داده شده است. مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف از استاندارد به‌ترتیب۱۷/۰۰، ۱۲۱/۰۰، ۴۲/۱۴ و ۳/۰۷ میلی‌گرم در میلی لیتر می‌باشند. هرچه میزان IC_{50} کمتر باشد نشان‌دهنده فعالیت مهار رادیکال آزاد بیشتر خواهد بود. فنل‌ها و فلاونوئیدها مسئول فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد هستند (Singh *et al.*,2009). رابطه معنی‌دار متغیرهای توان، حجم حلال و مقدار نمونه با IC_{50} مشاهده گردید. اثر متقابل متغیرهای توان و زمان، توان و مقدار نمونه، توان و حجم حلال، زمان و مقدار نمونه، زمان و حجم حلال، و مقدار نمونه و حجم حلال معنی‌دار بودند. بر اساس شکل ۳ (الف) در کمترین زمان، افزایش توان از ۱۰۰ به ۳۰۰ وات منجر به کاهش IC_{50} شد.در ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال (شکل ۳ (ب))، افزایش مقدار نمونه نزدیک به ۷ گرم، IC_{50} کاهش یافت و با افزایش مقدار نمونه از این میزان، افزایش نشان داد.

قدرت احیای آهن

اعداد ظرفیت احیای آهن در جدول ۳ و شکل ۳ گزارش شده است. حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف از استاندارد به‌ترتیب ۰/۲۴، ۴/۰۷، ۱/۶۹ و ۰/۱۴ میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم بودند. برای بررسی کیفیت عصاره به‌دست آمده، آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شدند. روش قدرت احیاکنندگی آهن، یک روش غیررادیکالی بر پایه انتقال الکترون است که احیای کمپلکس یون فریک-لیگاند به کمپلکس یون فروس-لیگاند را توسط آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه می‌گیرد. این روش، همبستگی ضعیفی با دیگر روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که این روش در ترکیب با روش‌های دیگر در تشخیص مکانیسم‌های غالب برای آنتی‌اکسیدان‌های مختلف مورد استفاده قرار بگیرد (Shahidi & Zhong, 2015).

رابطه معنی‌دار متغیرهای توان، زمان، مقدار نمونه و حجم حلال با قدرت احیای آهن وجود داشت. اثر متقابل متغیرهای توان و زمان، توان و حجم حلال، زمان و مقدار نمونه، و زمان و حجم حلال معنی‌دار بودند. در کمترین حجم حلال (شکل ۳ (ج))، افزایش توان تا تقریبا ۲۰۰ وات، منجر به افزایش قدرت احیای آهن گردید اما در سطوح بالاتر توان، قدرت احیای آهن کاهش یافت. در زمان ۵ دقیقه و ۵ گرم نمونه (شکل ۳ (د)) قدرت احیای آهن بالاتری مشاهده گردید، اما افزایش زمان موجب کاهش قدرت احیای آهن شد.

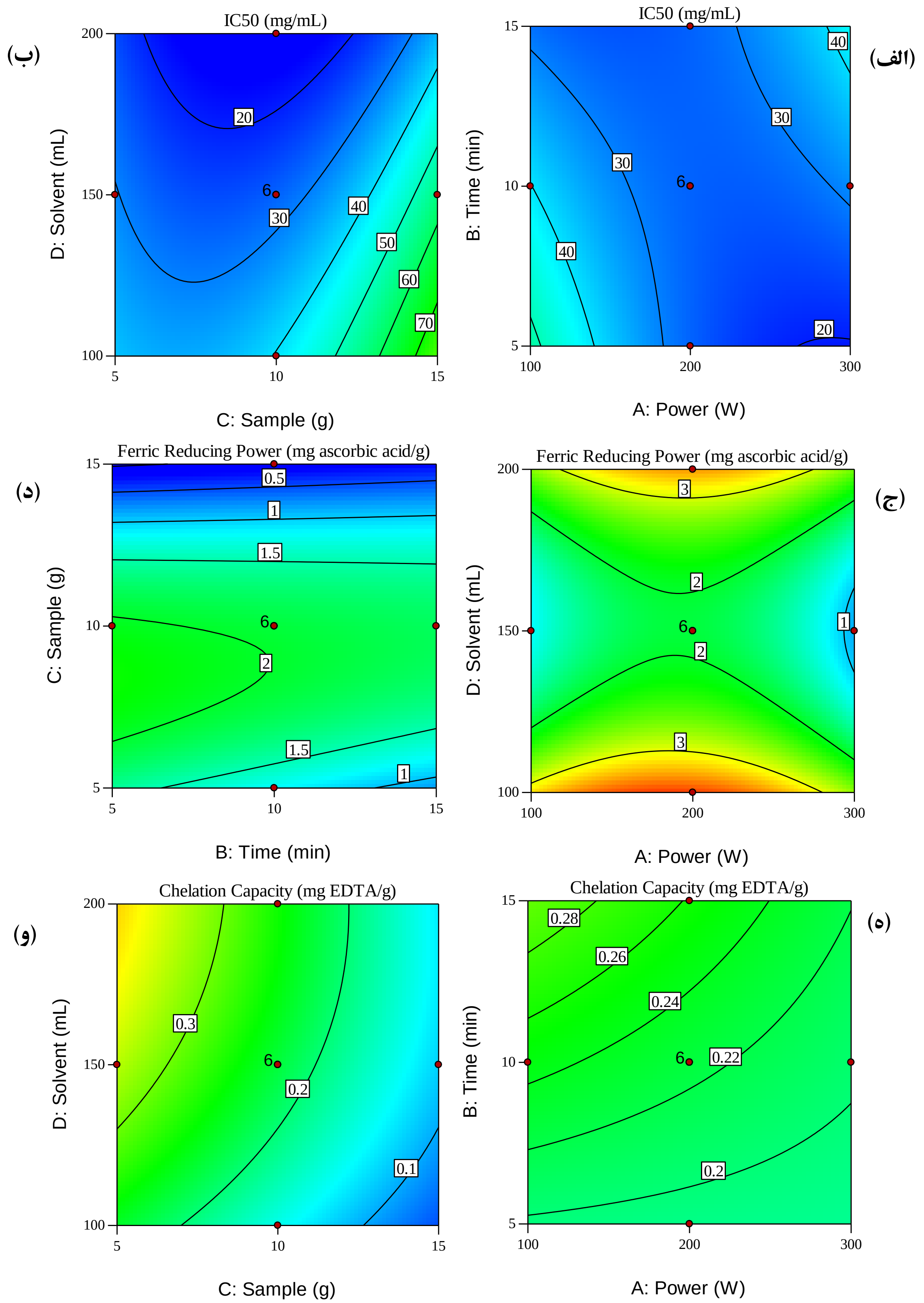
افزایش حجم حلال موجب کاهش قدرت احیای آهن گردید. افزایش حجم حلال ممکن است ترکیبات مسئول احیا کردن آهن را رقیق کند به همین دلیل با افزایش حجم حلال، قدرت احیای آهن کم شده است. توان در سطوح بالا، باعث کاهش قدرت احیای آهن گردید. توان مایکروویو بر دما اثر می‌گذارد؛ بدین صورت که افزایش توان، دمای فرآیند استخراج را افزایش می‌دهد. در همین راستا، Singh و همکاران (۲۰۱۱) عصاره ای از پوست زمینی به کمک مایکروویو استخراج کردند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را بررسی نمودند. آنها گزارش کردند که با افزایش توان (در بیشتر از ۲۰۰ وات)، میزان آسکوربیک اسید عصاره کاهش یافته بود.

ظرفیت احیای مس

اعداد ظرفیت احیای مس در جدول ۳ نشان داده شده است. حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف از استاندارد به‌ترتیب ۰/۷۶، ۷/۸۸، ۴/۳۶ و ۰/۷۳ میلی گرم آسکوربیک اسید بر گرم بوده‌اند. این روش، قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها در تبدیل مس دو ظرفیتی به مس تک ظرفیتی را اندازه‌گیری می‌کند (Shahidi & Zhong, 2015). رابطه معنی‌دار متغیر توان و متغیر زمان با ظرفیت احیای مس وجود داشت. افزایش توان تا ۲۰۰ وات منجر به افزایش ظرفیت احیای یون مس گردید اما با افزایش بیشتر در توان (از ۲۰۰ وات به ۳۰۰ وات)، ظرفیت احیای مس کاهش یافت. اثر متغیر زمان بر ظرفیت احیای یون مس به‌صورت افزایشی بود. اثر متقابل معنی‌داری بین متغیرها با ظرفیت احیای مس مشاهده نگردید.

ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن

اعداد ظرفیت کلاته‌کنندگی در جدول ۳ و شکل ۳ نشان داده شده است. مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف از استاندارد به‌ترتیب ۰/۰۲، ۰/۴۸، ۰/۲۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم EDTA بر گرم می‌باشند. برخی آنتی‌اکسیدان‌ها مانند فلاونوئیدها، کلاته‌کننده‌های فلزی قدرتمندی هستند. این آنتی‌اکسیدان‌ها به آسانی یون‌های‌فلزی پرواکسیدانی را غیرفعال می‌کنند و بنابراین از اکسیداسیون لیپیدی که توسط یون‌های فلزی ایجاد می‌شوند، ممانعت کرده و یا به تاخیر می‌اندازند (Shahidi & Zhong, 2015).رابطه تمام متغیرها با ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن معنی‌دار بود. اثر متقابل متغیرهای توان و زمان، توان و مقدار نمونه، توان و حجم حلال، زمان و حجم حلال، و مقدار نمونه و حجم حلال معنی‌دار بودند.



شکل ۳- اثر متغیرهای توان، زمان، مقدار نمونه و حجم حلال بر IC_{50}، قدرت احیای آهن و ظرفیت کلاته‌کنندگی‌آهن.

جدول ٤- میزان بازدهی، ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استخراج شده به کمک مایکروویو به صورت پیش‌بینی شده و به‌صورت تجربی در شرایط بهینه و مقایسه با روش استخراج به کمک همزن مغناطیسی

پاسخ	تجربی (مایکروویو)	پیش‌بینی شده	خطا (درصد)	همزن مغناطیسی	اختلاف (درصد)
میزان بازدهی[١]	۱۲/۷۳	۱۱/۵۷	-۹/۱۱	۱۳/۱۶	۳/۳۸
میزان ترکیبات فنل کل[٢]	۱۵۰۸۰/۸۰	۱۵۵۵۰/۵۰	۳/۱۱	۱۶۰۰۳/۷۴	۶/۱۲
میزان فلاونوئید کل[٣]	۱۳۸۷/۹۰	۱۴۷۶/۲۲	۶/۳۶	۱۴۳۶/۷۴	۳/۵۲
IC_{50}[٤]	۱۱/۹۶	۱۱/۳۳	-۵/۲۶	۱۱/۲۳	-۶/۱۰
قدرت احیای آهن[٥]	۶/۹۸	۷/۱۲	۲/۰۰	۷/۰۶	۱/۱۴
ظرفیت احیای مس[٦]	۵/۹۹	۶/۴۴	۷/۵۱	۶/۱۸	۳/۱۷
ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن[٧]	۰/۴۱	۰/۴۳	۴/۸۷	۰/۴۴	۷/۳۱

[١]درصد، [٢] میکروگرم معادل گالیک اسید بر گرم نمونه؛ [٣] میکروگرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه؛ [٤]میلی‌گرم در میلی لیتر؛ [٥] میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه؛ [٦]میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم نمونه؛ [٧]میلی‌گرم EDTA بر گرم نمونه

بر اساس شکل ۳ (ه) در زمان ۱۵ دقیقه استخراج عصاره و در توان ۱۰۰ وات ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن بیشتری وجود داشت که با افزایش توان از ۱۰۰ به ۳۰۰ وات، ظرفیت کلاته‌کنندگی عصاره کاهش یافت. در ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال، افزایش مقدار نمونه از ۵ به ۱۵ گرم، موجب کاهش ظرفیت کلاته‌کنندگی گردید (شکل ۳ (و)).

بهینه‌سازی بازدهی و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی

نتایج بهینه‌سازی میزان بازدهی، میزان ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در جدول ۴ نشان داده شده است. شرایط بهینه، ۲۰۰ وات توان ،۱۲ دقیقه زمان استخراج، ۵ گرم نمونه و ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال به‌دست آمد. شرایط بهینه استخراج به کمک مایکروویو با روش متداول- استخراج به کمک همزن مغناطیسی- مقایسه شد. تفاوت معنی‌داری بین بازدهی، ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده به کمک مایکروویو با استخراج به کمک همزن مغناطیسی وجود نداشت

نتیجه‌گیری

استخراج عصاره پوسته دانه نارنج به کمک مایکروویو از نظر میزان بازدهی، میزان ترکیبات زیست‌فعال (فنل و فلاونوئید کل) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد، قدرت احیای آهن، ظرفیت احیای مس و ظرفیت کلاته‌کنندگی آهن) بهینه‌سازی گردید. نتایج بیانگر آن بود که استخراج به کمک مایکروویو، روشی مناسب و کاربردی برای استخراج عصاره از پوسته دانه نارنج با حفظ ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. همچنین، تفاوتی بین میزان بازدهی، میزان ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی‌اکسیدانی روش مایکروویو با روش متداول مشاهده نگردید.

منابع

کوشش، س.، گلمکانی، م.، ۱۳۹۴، بهینه‌سازی شرایط استخراج بتالائین از چغندر قرمز به کمک مایکروویو و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل، نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۷، ۶۰-۳۹.

AACC, American Association of Cereal Chemists. 2000.

Anal, A.K., Jaisanti, S., & Noomhorm, A., 2014, Enhanced yield of phenolic extracts from banana peels (*Musa acuminata* Colla AAA) and cinnamon barks (*Cinnamomum varum*) and their antioxidative potentials in fish oil. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2632-2639.

Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S., 2010, Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120, 1185-1192.

Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., & Berset, C., 1998, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.

Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.C., & Kung, F.W.L., 2011, Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. Journal of Chromatography A, 1218, 6213-6225.

Chavan, P., Singh, A. K., & Kaur, G., 2018, Recent progress in the utilization of industrial waste and by-products of citrus fruits: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 41, e12895.

Chuyen, H.V., Nguyen, M.H., Roach, P.D., Golding, J.B., & Parks, S.E., 2018, Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Science & Nutrition*, 6, 189-196.

Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., & Madani, K., 2013, Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products,* 50, 77-87.

Fidelis, M., Santos, J. S., Escher, G. B., do Carmo, M. V., Azevedo, L., da Silva, M. C., Putnik, P., & Granato, D., 2018, *In vitro* antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* Mcvaugh, Myrtaceae) seed coat: A multivariate structure-activity study. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 479-490.

Figueroa, J. G., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., & Segura-Carretero, A., 2018, Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food research international*, 105, 752-763.

Golmakani, M.T., & Moayyedi, M., 2016, Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and solvent-less microwave extraction of essential oil from dry and fresh Citruslimon (*Eureka variety*) peel. *Journal of Essential Oil Research*, 28, 272-282.

Güneşer, B. A., & Yilmaz, E., 2017, Effects of microwave roasting on the yield and composition of cold pressed orange seed oils. *Grasas y Aceites*, 68, e175.

Habibi, M., Golmakani, M.T., Mesbahi, G., Majzoobi, M., & Farahnaky, A., 2015, Ultrasound-accelerated debittering of olive fruits. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 105-115.

Hayat, K., Zhang, X., Chen, H., Xia, S., Jia, C., & Zhong, F., 2010, Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology,* 73, 371-376.

Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A., 2007, Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology,* 54, 44-50.

Jokić, S., Cvjetko, M., Božić, Đ., Fabek, S., Toth, N., Vorkapić-Furač, J., & Redovniković, I.R., 2012, Optimisation of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 2613-2619.

Kumar, K., Yadav, A.N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H.S., 2017, Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, 4, 18.

Maran, J.P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R., 2014, Microwave assisted extraction of pectin from waste Citrullus lanatus fruit rinds. *Carbohydrate polymers*, 101, 786-791.

Marin, F. 2017, Main Industrial Citrus By-Products in Spain— Citrus Dietary Fiber. P 409-428. *In:* X. Ye (ed.) Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods. CRC Press, Boca Raton, FL.

Oyetayo, V.O., Dong, C.H., & Yao, Y.J., 2009, Antioxidant and antimicrobial properties of aqueous extract from *Dictyophora indusiata*. *The Open Mycology Journal*, 3, 20-26.

Pascu, M., Pascu, D.E., Trăistaru, G.A., Nechifor, A.C., Bunaciu, A.A., & Aboul-Enein, H.Y., 2014, Different spectrophotometric methods for antioxidant activity assay of four Romanian herbs. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 11, 315-321.

Proestos, C., & Komaitis, M., 2008, Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 652-659.

Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Devi, J.P., Kumar, V.H.T. & Kekuda, T.R.P., 2012, Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions*, 1, 303-310.

Sagar, N.A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E.M., & Lobo, M.G., 2018, Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 512-531.

Satari, B., & Karimi, K., 2018, Citrus processing wastes: environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. Resources, *Conservation and Recycling*, 129, 153-167.

Shahidi, F., & Zhong, Y., 2015, Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.

Simić, V.M., Rajković, K.M., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Nikolić, N.Č., Lazić, M.L., & Karabegović, I.T., 2016, Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology*, 160, 89-97.

Singh, A., Sabally, K., Kubow, S., Donnelly, D.J., Gariepy, Y., Orsat, V., & Raghavan, G.S.V., 2011, Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from potato peels. *Molecules*, 16, 2218-2232.

Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Singh, D.P., Sarma, B.K., Upadhyay, G., & Singh, H.B., 2009, Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology,* 47, 1161-1167.

Setyaningsih, W., Saputro, I.E., Palma, M., & Barroso, C.G., 2015, Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*, 169, 141-149.

Vinatoru, M., Mason, T.J., & Calinescu, I., 2017, Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.

Xiao, W., Han, L., & Shi, B., 2008, Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali. *Separation and Purification Technology*, 62, 614-618.

Ye, X., Chen, J., Xu, J., & Chen, J., 2017, Citrus Fruits, Varieties, Chemical Properties, and Products in the Processing Industry. P.1-36. *In:* X. Ye (ed.) Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods. *CRC Press, Boca Raton*, FL.

Yilmaz, E., & Güneşer, B. A., 2017, Cold pressed versus solvent extracted lemon (*Citrus limon* L.) seed oils: yield and properties. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1891-1900.

Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 605-619

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۶۱۹-۶۰۵

Optimization of antioxidant properties of sour orange seed coat extract using microwave-assisted extraction

M. T. Golmakani[1*], Gh. R. Mesbahi[2], N. Alavi[3], A. Hosseinzade Farbudi[4]

Received: 2018.12.21
Accepted: 2019.06.16

Introduction: Food wastes and losses are produced during all phases of food life cycles. The highest wastes belong to the processing of fruits and vegetables. Bioactive compounds have the potential to be extracted from the by-products of fruits and vegetables which can be used in the food processing. Extraction of flavor compounds, phenolic compounds, enzymes, and organic acids from wastes of fruits – pomace, peel, and seeds of citrus fruits, pomace and leave of apple, seeds of grape, and peel of kiwifruit – and vegetables – pomace of carrot, husk of garlic, skin of onion, peel of potato, and skin of tomato – have been reported (Sagar *et al.,* 2018).

Sour orange, *Citrus aurantium*, is one of the species of citrus fruits. Sour orange seeds contain fats, protein, and bitter compounds which affect citrus processing (Ye *et al.,* 2017). Naringin, neohesperidin, flavon, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, and sinapic acid have been detected in methanolic extract of sour orange seeds (Bocco *et al.*, 1998).

Bioactive compounds are recovered from food wastes through various conventional and novel extraction techniques. Microwave-assisted extraction is one of the most used novel and environmentally friendly extraction methods. Advantages of microwave-assisted extraction over conventional extraction techniques include automated operation, more effective and selective heating, and less extraction time (Vinatoru *et al.*, 2017).

The objective of this study was optimization of microwave-assisted extraction of sour orange seed coat extract in terms of microwave power level, extraction time, sample quantity, and solvent volume on yield, bioactive compounds (total phenolic content and total flavonoid content), and antioxidant activity (free radical scavenging activity, ferric ion reducing antioxidant power, cupric ion reducing antioxidant capacity, and ferrous ion chelating). Also, optimum conditions of microwave-assisted extraction was compared to that of conventional magnetic stirrer-assisted extraction method.

Materials and methods: Sour orange seeds were purchased from Limondis Company (Beyza, Fars province, Iran). Microwave-assisted extraction conditions including microwave power level (100, 200, and 300 W), extraction time (5, 10, and 15 min), sample quantity (5, 10, and 15 g), and solvent (methanolvolume 100, 150, and 200 mL) were optimized. Yield, bioactive compounds (total phenolic content (Habibi *et al.*, 2015) and total flavonoid content (Habibi *et al.*, 2015)), and antioxidant activity (free radical scavenging activity (Habibi *et al.*, 2015), ferric ion reducing antioxidant power (Rekha *et al.*, 2012), cupric ion reducing antioxidant capacity (Pascu *et al.*, 2014), and ferrous ion chelating (Oyetayo *et al.*, 2009)) of sour orange seed coat extract were evaluated. After determining the optimum conditions of microwave-assisted extraction, yield, bioactive compounds (total phenolic content and total flavonoid content), and antioxidant activity of sour orange seed coat extract were compared to those of conventional magnetic stirrer-assisted extraction method. Design Expert software (Version 10, Stat-Ease, Minneapolis, MN) was employed for analyzing four variables – microwave power level, extraction time, sample quantity, and solvent volume – at three levels consisting 30 experimental runs. Response surface methodology concerning central composite design (6 center points, quadratic model, and face center = 1) was applied.

Results and discussion: Optimum conditions of microwave-assisted extraction were microwave power level of 200 W, extraction time of 12 min, sample quantity of 5 g, and solvent volume of 200 mL. Under optimum conditions, yiled, total phenolic content, total flavonoid content, IC_{50}, ferric ion reducing antioxidant power, cupric ion reducing antioxidant capacity, and ferrous ion chelating were11.57%, 15550.50 µg gallic acid equivalent/g, 1476.22 µg quercetin equivalent/g, 11.33 mg/mL, 7.12 mg ascorbic/g, 6.44 mg ascorbic acid/g, and 0.43 mg EDTA/g, respectively. Intermediate microwave power level (200 W) can be more suitable from an industrial perspective and energy consumption (Jokić *et al.*, 2012). Further increase in microwave power level, i.e. higher than 200 W, causes thermal degradation of bioactive compounds (Dahmoune *et al.*, 2013), decreasing total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of sour orange seed coat extract. The highest extraction time gives the bioactive compounds a chance to diffuse and release from the cell matrix to the surrounding environment (solvent). The highest solvent volume was selected as the optimum extraction condition. By increasing solvent volume up to 200 mL, meaning a greater gradient in bioactive compound concentration,

1, 2, 3 and 4. Associate Professor, Assistant Professor, PhD Student, Former MSc Student, Department of Food Science and Technology, Shiraz University, Shiraz, Iran
(*Corresponding Author Email: golmakani@shirazu.ac.ir)

mass transfer was also improved (Dahmoune *et al.*, 2013). Also, the minimum sample quantity (5 g) was determined in optimum conditions. Increasing sample quantity (while the solvent volume remained constant) reduces the surface area available for the solvent to penetrate the sample matrix. As a result, higher sample quantity caused lower extraction of bioactive compounds (Ballard *et al.*, 2010). There were no significant differences between yield, bioactive compounds, and antioxidant activity of extract obtained by conventional-assisted extraction method in comparison with those of microwave-assisted extraction. In conclusion, microwave-assisted extraction, as a green and fast method, can be proposed as a suitable and practical method for extraction of bioactive compounds from sour orange seed coat.

Keywords: Antioxidant activity, Extraction, Microwave, Sour orange seed coat